

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Année scolaire 1900-1901. — N° 169

TECHNIQUE

DE LA

COLORATION DES LEUCOCYTES

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Et soutenue publiquement le 12 juillet 1901

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

LÉON MONTAGARD

Né à Caumont (Vaucluse), le 4 Décembre 1872



LYON

IMPRIMERIE PAUL LEGENDRE & C^{ie}

Ancienne Maison A. WALTENER

14, rue Bellecordière, 14

—
1901

FACULTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Année scolaire 1900-1901. — N° 169

TECHNIQUE
DE LA
COLORATION DES LEUCOCYTES

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Et soutenue publiquement le 16 juillet 1901

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

LÉON MONTAGARD

Né à Caumont (Vaucluse), le 4 Décembre 1872



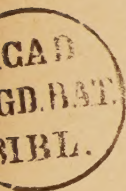
LYON

IMPRIMERIE PAUL LEGENDRE ET C^{ie}

Ancienne Maison A. Waltener

14, rue Belle-Cordière, 14

—
1901



PERSONNEL DE LA FACULTÉ

MM. LORTET	DOYEN.
LACASSAGNE.	ASSESEUR.
CROLAS	QUESTEUR.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. PAULET, CHAUVEAU, BERNE

PROFESSEURS

Cliniques médicales.	}	MM. LÉPINE.
Cliniques chirurgicales.		BONDET.
Clinique obstétricale et Accouchements		BARD.
Clinique ophtalmologique.		PONCET.
Clinique des Maladies cutanées et syphilitiques		X.
Clinique des Maladies mentales		FOCHIER.
Physique médicale		GAYET.
Chimie médicale et pharmaceutique.		GAILLETON.
Chimie organique et Toxicologie		PIERRET.
Matière médicale et Botanique.		MONOYER.
Parasitologie		HUGOUNENQ.
Anatomie.		CAZENEUVE.
Anatomie générale et Histologie.		FLORENCE.
Physiologie.		LORTET.
Pathologie interne.		TESTUT.
Pathologie externe		RENAUT.
Pathologie et Thérapeutique générales		MORAT.
Anatomie pathologique.		TEISSIER.
Médecine opératoire.		AUGAGNEUR.
Médecine expérimentale et comparée.		MAYET.
Médecine légale		TRIPPIER.
Hygiène.		POLLOSSON (M.).
Thérapeutique		ARLOING.
Pharmacologie		LACASSAGNE.
		COURMONT.
		SOULIER.
		CROLAS.

PROFESSEUR ADJOINT

Clinique des Maladies des Femmes. M. LAROYENNE.

CHARGÉS DE COURS COMPLÉMENTAIRES

Clinique des Maladies des Enfants	MM. WEILL,	agrégé
Maladies des voies urinaires.	CHANDELUX,	—
Maladies des oreilles, du nez et du larynx	LANNOIS,	—
Accouchements.	POLLOSSON (A.),	—
Propédeutique médicale	ROQUE,	—
Propédeutique chirurgicale.	GANGOLPHE,	—
Botanique.	BEAUVISAGE,	—

AGRÉGÉS

MM.	MM.	MM.	MM.
BEAUVISAGE.	CONDAMIN.	VALLAS.	PAVOT.
ROQUE.	DEVIC.	SIRAUD.	NOVÉ-JOSSERAND.
ROUX.	COLLET.	DURAND.	BERARD.
POLLOSSON (A.)	BOYER.	DOYON.	SAMBUC.
ROCHET.	BARRAL.	PIC.	BORDIER.
ROLLET.	MOREAU.		

M. BEAUDUN, Secrétaire.

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

M. COURMONT, Président ; M. BOYER, Assesseur
MM. PAVIOT et SAMBUC, Agrégés.

La Faculté de médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les Dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

Monsieur le PROFESSEUR J. COURMONT



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552409_0018

INTRODUCTION

Ce travail, s'il remplit le but que son auteur se proposait, serait un résumé des différentes méthodes de coloration des leucocytes du sang. Il doit être simple et très précis.

Nous avons été frappé, en effet, du peu d'importance que l'on paraît attacher à la technique de l'examen du sang et combien peu de chercheurs, en France, ont apporté de méthode nouvelle afin de faciliter cette étude.

M. Hayem a bien encouragé les cliniciens en leur disant, dès 1889, que l'avenir était à l'hématologie ; M. Gilbert a dit, plus récemment, que le présent était à l'hématologie et, cependant, paraissaient en Allemagne des livres de technique qui sont des modèles de précision et où le souci du détail se retrouve à chaque ligne.

Les traités classiques de médecine ne sont pas très documentés sur la technique hématologique; seul paraît faire exception l'article de M. Parmen-tier dans le Traité de MM. Brouardel-Gilbert, (Paris, 1899, tome VI, page 789). Les diverses formes leucocytaires sont décrites, mais la technique y est fort écourtée.

M. J. Sabrazès, dans son rapport, au Congrès de Lille, sur les leucémies et les adénies, nous montre l'importance des travaux rénovateurs de P. Ehrlich. Sous l'impulsion du professeur de Francfort, l'hématologie est entrée dans une voie nouvelle et l'application des méthodes de coloration paraît devoir faciliter l'étude des problèmes de la leucémie et des défenses organiques contre les infections.

Les nombreux et importants travaux de MM. Widal, Ravaut, Sicard, Merklen sur la cytologie ont donné à l'étude des leucocytes une nouvelle importance.

L'hématologie, devenant clinique, est donc appelée à rendre des services et les cas ne sont pas rares où elle a pu résoudre des diagnostics cliniques hésitants. La chirurgie, elle-même, y a recours et M. Laignel (1) dernièrement, demandait à l'examen leucocytaire la confirmation d'un diagnostic d'appendicite.

En dehors de cet intérêt diagnostic immédiat, l'étude des leucocytes a inspiré dans ces dernières années des travaux nombreux et intéressants: sur la fièvre typhoïde, la diphtérie, les fièvres érupti-

(1) LAIGNEL, *Société Médicale des Hôpitaux*, 19 avril 1904.

ves, la rage. Gardons-nous cependant, d'un optimisme exagéré, les recherches portent sur des cas cliniques et entraînent de ce fait une incertitude relative, née de l'impossibilité où l'on se trouve de jamais saisir la certitude mathématique en clinique. W. Türck (1) nous a déjà dit :

Wie in jeder jungen Wissenschaft, so ist man auch in der Hamatologie im Sturme der ersten Begeisterung über das Ziel hinausgegangen.

Qu'il nous soit permis de remercier M. le Professeur Courmont de l'honneur qu'il nous fait en acceptant la présidence de notre thèse et nous le prions de recevoir l'expression de notre vive gratitude ainsi que le témoignage de notre reconnaissance. Il nous a inspiré ce travail et c'est à lui qu'en revient tout l'honneur.

Nous ne saurions oublier la grande bienveillance de nos maîtres de la Faculté et des Hôpitaux de Lyon auxquels nous adressons l'expression de notre vive gratitude.

Nous devons rappeler ici l'excellent souvenir de nos maîtres des Hôpitaux de Marseille; que MM. les professeurs Fallot, Laget et Arnaud, médecins de l'Hôtel-Dieu veuillent bien agréer nos hommages les plus respectueux.

L. M.

(1) W. TURCK. Kl Uuters. p. 1.

CHAPITRE PREMIER

De la numération des globules blancs.

Pour faire avec précision une numération leucocytaire, il est un grand nombre de précautions indispensables à observer et, tout d'abord, le *choix d'un appareil*.

L'appareil compte-globules de Mallassez est à rejeter. Les traits du carré sont peu visibles, s'il y a beaucoup de globules ; le bord des lignes s'écaille, le ressort de pression s'affaiblit avec le temps et le pivot métallique est toujours plus ou moins attaqué par les mélanges employés, surtout si ceux-ci sont acidifiés.

Nous ne décrivons pas l'appareil Hayem-Nachet ; c'est celui qui sert pour la numération des globules

rouges. De préférence, on se servira du modèle avec platine mobile transversalement grâce à une vis de pression, permettant de déplacer la cellule régulièrement.

Pour l'examen microscopique, on se servira d'un oculaire 2, objectif 7 du microscope Leitz.

L'appareil de Hayem est imparfait. Alferow (1), dans les *Archives de Physiologie*, a montré que la profondeur théorique de $\frac{1}{5}$ de millim. était loin d'être toujours réalisée.

M. Mayet (2) a trouvé également que des erreurs de 6 à 800 globules blancs pouvaient se glisser dans les calculs.

Malgré ces imperfections d'appareils, si on a soin de suivre, chaque fois, exactement la même technique, on arrive à des résultats comparables. Il sera toujours bon de vérifier expérimentalement son appareil, en numérant le sang de deux ou trois individus sains. Si on obtient des chiffres variant entre 6000 et 8000, on considérera l'appareil comme suffisant.

L'appareil décrit par MM. Lyonnet et Martel est simple, la numération peut se faire facilement (3). Nous lui trouvons un inconvénient, c'est le gros calibre du tube servant à faire la prise du sang. Il est toujours plus difficile d'affleurer exactement le sang au point voulu ; de plus, il faut une assez

(1) ALFEROW. — *Archives de Physiologie*, 1884, p. 271.

(2) MAYET. — *Lyon Médical*, 3 février 1901, p. 153.

(3) LYONNET ET MARTEL. — *Lyon Médical*, 1899, 30 juillet, p. 431.

MARTEL. — Thèse de Lyon, 1899.

grande quantité de sang. Si on a à faire une numération leucocytaire chez un enfant, il faudra une piqûre plus profonde ; si le sang vient mal, on sera tenté de faire de l'expression du doigt ce qui faussera le résultat. De plus les coagulations sont fréquentes à l'intérieur de ce tube.

Néanmoins cet appareil est pratique et très employé.

Nous pensons qu'il est nécessaire d'avoir de bons appareils, bien construits et vérifiés. Cependant on a pu faire des travaux très sérieux avec des appareils donnant des chiffres trop élevés.

Le travail de Zéleneff sur la leucocytose de la syphilis est de première importance, bien que cet auteur ait employé un appareil donnant pour le sang normal des chiffres de 9.000 leucocytes par millimètres cubes.

LA SOLUTION

Quelles solutions emploierons-nous ?

Malgré l'avis de M. Mayet, nous pensons, avec la plupart des auteurs, que les solutions acétiques détruisant les hématies sont les meilleures.

Nous recommandons la solution suivante :

Chlorure de sodium.....	1g
Sulfate de soude.....	0g50c
Eau distillée.....	100g

Faire dissoudre. On ajoutera avant de s'en servir un gramme d'acide acétique.

De cette façon on aura toujours un liquide fraîchement préparé ; avec le temps l'acide acétique s'évapore et les numérations deviennent difficiles du fait de la présence d'hématies incomplètement détruites.

PRISE DU SANG.

Le sang sera obtenu par piqure de la pulpe du doigt, au moyen d'une lancette, d'un vaccino-stylé ou d'une simple aiguille flambée. Le doigt sera lavé à l'éther puis trempé pendant quelques minutes dans de l'eau tiède. Le refroidissement du doigt produit par l'évaporation de l'éther est ainsi évité. Chantemesse et Rey (1) ont montré que le froid faisait varier le nombre des leucocytes contenus dans les vaisseaux.

La première goutte de sang qui sort de la piqure est essuyée, elle est souvent altérée par l'humidité du doigt. On se servira pour la numération de la deuxième goutte.

On aspire le sang rapidement dans la pipette capillaire jusqu'à la division 5 qui correspond à 5 mil. c. ; on affleure très exactement, on essuie l'extrémité du tube capillaire qui contient souvent une goutte de sang. On plonge le tube capillaire dans le mélangeur contenant 500 mm. c. de sérum

(1) REY. — Etude clinique et exp. de la leucocytose de l'érysipèle, Th. Parts, 1899. — CHANTEMESSE et REY. — Soc. Biol. 18 Janvier 1899.

acétique. On souffle dans le tube, le sang se mélange au sérum, on aspire un peu de celui-ci pour laver le tube. On agite avec la palette de verre pendant quelques instants, une à deux minutes. On met une goutte du mélange dans la cellule, on la recouvre d'une lame rodée spéciale et on fait la numération.

On a une solution de sang à $5/496$ ou à $1/99.2$, on compte 10 cubes de $1/5$ de mm. de côté et on multiplie le nombre de globules obtenus par 1240. On répète deux ou trois fois cette opération et on fait une moyenne.

Cette dilution du sang à $1/0/0$ a le double avantage de ne pas nécessiter l'emploi d'un coefficient élevé (1240) ; et de ne pas présenter trop de leucocytes dans le champ du microscope. Avec un sang normal, on a, en moyenne, un leucocyte par deux carrés examinés.

DES SÉRUMS COLORÉS

Pour rendre la numération plus facile et pour éviter de confondre des globules rouges et des lymphocytes (la confusion nous paraît fatale si on ne détruit pas les hématies), divers auteurs ont proposé l'emploi de sérums colorés. Zappert (1) re-

(1) J. ZAPPERT. — *Centralblatt f. Klin. Medic.*, 1892, n° 19, p. 1.

commande de remplir l'éprouvette Thomas-Zeiss avec du sang jusqu'à la division 1; ensuite on ajoute une solution d'acide osmique à 1 %, de façon à remplir à moitié l'éprouvette. On agite pendant une à deux minutes pour faire agir l'acide osmique; on finit le remplissage de l'éprouvette avec la solution suivante :

Eau distillée.....	55 ^{cc}
Glycérine	45 ^{cc}
Solution d'éosine à 1 %.....	17 ^{cc}

On secoue ensuite fortement et on fait la numération : les hématies sont rouges ; les leucocytes frappent le regard par leur contour net et leur éclat. Ils ont un noyau rouge, environné de nucléoles non colorés. Les éosinophiles sont rouges. Cette méthode excellente pour numérer des éosinophiles, a l'inconvénient de ne pas mettre assez en évidence les noyaux leucocytaires. Aussi a-t-on substitué à la coloration par l'éosine, la coloration par le bleu du méthylène ou par le violet de gentiane. Voici la formule d'un sérum coloré donnée par MM. Barjon et Regaud (1).

Chlorure du sodium.....	3	} aâ 265 ^{cc}
Eau distillée.....	100	
Sulfate de soude	5	
Eau distillée.....	100	
Gomme	8	} 65 cc
Eau distillée	100	

(1) BARJON et REGAUD. — Des procédés de numération des globules blancs, basés sur l'emploi des sérums artificiels colorés. — *Lyon Méd.*, 1895, p. 115.

On ajoute à 50 c.c. de cette solution, cinq gouttes d'une solution alcoolique de violet de gentiane à 5 0/0.

Ces sérums colorés ne donnent pas toujours de bons résultats. Assez souvent le violet se précipite, les noyaux sont mal colorés ; de plus les hématies gênent quelquefois. Le sang est très dilué, il faut multiplier le nombre obtenu par un coefficient élevé et les chances d'erreur sont grandes. Nous avons abandonné cette méthode.

Nous en dirons autant des procédés de Welcker, basés sur la sédimentation des leucocytes. On lit sur un tube gradué le nombre des leucocytes d'après l'épaisseur du culot ; c'est un procédé analogue à celui d'Esbach pour doser l'albumine.

Le centrifugeur compte globules de Krauss est tout aussi imparfait, les résultats ne sont que très approximatifs.

CHAPITRE II

Technique de la coloration des leucocytes

Avant d'aborder l'étude de la technique de la coloration des leucocytes, il est bon de dire ce qu'est un globule blanc, et quelles en sont les variétés.

Le globule blanc a d'abord été caractérisé par son noyau. Il se différenciait par là du globule rouge ; puis en 1875, Ranvier montra que les globules blancs présentaient des granulations protoplasmiques. La classification de Max Schultze, purement morphologique et datant de 1875, ne tarda pas à être bouleversée et avec la communication d'Ehrlich 1878, naît une classification des leucocytes, d'après les granulations. Celles-ci deviennent aussi importantes que la forme du noyau, pour différencier les leucocytes entre eux.

Actuellement, et sans vouloir préjuger en rien de leur signification physiologique, ou de leur évolution, nous pouvons diviser les leucocytes en :

1^o *Lymphocytes*. — Ce sont des éléments de la dimension d'un globule rouge. Ils sont formés par un noyau compact, avide des colorants basiques, généralement géométriquement rond, rarement échancré. Ce noyau présente à son intérieur un à deux nucléoles ; sa périphérie est environnée d'un halo protoplasmique, limité par une membrane nucléaire très nette. Ces lymphocytes se divisent un peu arbitrairement en petits (6 μ), moyens (6 à 8 μ) et grands (9 à 10 μ). Ces derniers se rencontrent surtout chez l'enfant, ou dans des états pathologiques. Chez l'adulte sain, les lymphocytes représentent 20 à 24 % des leucocytes.

2^o *Les mononucléaires*. — Ce sont des leucocytes à un seul noyau et à protoplasma plus abondant que celui des leucocytes. La seule variété bien différenciée est le grand mononucléaire pâle. Le noyau est périphérique, le protoplasma est peu dense et, même dans les préparations les mieux colorées, le noyau n'apparaît que comme une tache claire, presque transparente, mal délimitée du protoplasma qui est encore plus pâle. Normalement ce mononucléaire n'a pas de granulations. Diamètre 15 à 20 μ . (1 à 3 % des leucocytes).

3^o *Les formes de transition* « Uebergangsformen »

d'Ehrlich. — Le noyau est incurvé en haricot, en rein, 2 à 4 %.

4° *Le polynucléaire* représente 66 à 70 % des leucocytes du sang normal. Le noyau est incurvé en S, en Z, en Y; les prolongements sont tous réunis par un fil ténu, et l'expression de polylobaire leur conviendrait mieux que celle de polynucléaire. Le noyau est très facile à colorer, le protoplasma est semé de granulations neutrophiles visibles seulement à de forts grossissements. Ces granulations sont séparées par des espaces clairs. La membrane d'enveloppe de cet élément est nette. Le diamètre est de 10 à 15 μ . Parfois les contours sont peu nets.

5° *Le polynucléaire éosinophile* (1 à 2 0/0) a le même noyau que le précédent. Le protoplasma est semé de grosses granulations acidophiles, rondes, donnant l'impression d'une grappe en relief. Le contour est presque toujours flou, souvent le leucocyte est comme éclaté, les granulations sont alors plus ou moins éloignées de leur noyau.

6° *Les Mastzellen.* — De 0,5 à 1 0/0. Le noyau est celui des intermédiaires ou des polynucléaires; le protoplasma est semé de granulations basophiles. Ce sont des éléments difficiles à colorer, souvent invisibles si la préparation n'est pas très soignée.

Dans le sang pathologique on peut rencontrer :

1° Des *mononucléaires à granulations neutrophiles* ou *myélocytes*. Le noyau est souvent lobé, gros, mal délimité, il est entouré d'un protoplasma peu

dense, à grains neutrophiles. Ce sont de grands éléments (10 à 30 μ).

2° *Mononucléaires éosinophiles.*

3° Les *pseudo-lymphocytes à grains neutrophiles d'Ehrlich.*

4° Les *Reizungsformen de Türck*, ou cellules inflammatoires, ressemblant beaucoup aux grands mononucléaires.

Ces différentes formes leucocytaires ont été différenciées entre elles, surtout depuis l'emploi des colorants. Nous allons rapidement envisager quels sont les colorants employés, quelles sont leurs propriétés principales et sur quels éléments elles agissent avec élection. Ce chapitre demanderait une étude chimique des plus compliquées, nous n'avons ni la compétence voulue, ni l'autorité nécessaire pour l'écrire.

La Coloration

On distingue d'une façon un peu schématique les couleurs en deux groupes, les couleurs *basiques* et les couleurs *acides*.

Parmi les plus employées, on a :

COULEURS BASIQUES	COULEURS ACIDES
Fuschine.	Fuchsine S.
Auramine.	Violet S.
Chrysoïdine.	Eosines.
La vesuvine (Brun Bismarck).	Fluorescéines.
Vert brillant.	Orange G.
Vert malachite.	Vert lumière Lichtgrün F. S.
Violet de méthyle.	Acide picrique.
Violet d'alhiaz.	Picrate d'ammoniaque.
Bleu victoria.	Induline (nigrosine).
Safranine.	Purpurine.
Bleu de méthylène.	Tropéoline.
Vert de méthyle.	
Violet de gentiane.	
Thionine.	
Hématéines.	

COLORANTS NEUTRES

Picrate de rosaniline.
Triacidlösung d'Ehrlich.

Ces colorants ont été presque tous employés en technique hématologique. Nous n'étudierons ici que les principaux. Mais avant, il est bon de faire remarquer que les mots de basique et d'acide, employés pour désigner ces couleurs, ne sont pas chimiquement exacts. Certaines fuschines sont acides, d'autres basiques, cela dépend de la marque et du fabricant. Ainsi pour citer une des couleurs les plus employées la « triacidlösung » d'Ehrlich, qui colore les granula-

tions neutrophiles est en réalité acide. Borissoff (1) a montré que toutes les granulations sont amphophiles. Nous avons essayé de colorer du sang avec un réactif des bases, la phénol-phtaléine en solution. Nous pensions que ce réactif colorerait en rouge les points basiques. Il n'en a rien été, et la préparation est restée incolore. Pour la phtaléine du phénol, il n'y a donc pas dans le sang d'éléments réagissant comme les bases.

LES EOSINES.

L'éosine est au point de vue chimique le résultat de l'action de l'anhydride phtalique sur du phénol ; ce sont des phtaléines. Les éosines sont des colorants diffus, abandonnés pour la technique microscopique générale. Il existe dans le commerce une grande quantité d'éosine que l'on désigne par Eosine A., Eosine B., Eosine C., éosine jaune (Merck), éosine soluble.

Nous nous servons de l'éosine soluble de la Société Française des produits chimiques, 49, rue Hoche, à Pantin ; ou de l'éosine de l'Actiengesellschaft für Anilinfabrikation, à Berlin.

L'éosine jaune de Merck est à rejeter.

On fait à froid une solution d'éosine à 1 % dans l'eau distillée ; on filtre le lendemain et la solution est prête à employer.

(1) BORISSOFF. — *Soc. path. de Londres*, 19 octobre 1897.
Des granulat. amphophiles.

Cette solution est très résistante et conserve indéfiniment sa vigueur de teinte et sa rapidité de coloration.

L'Hématéine est le principe actif colorant de l'hématoxyline qui, elle-même, est extraite du bois de campêche. Nous nous servons de l'Hématéine ammoniacale de Grübler. L'hématéine purissima du même fabricant est bien inférieure pour le but que nous nous proposons.

Nous préparons la solution suivant la formule qui nous a été communiquée par M. Cade et que l'on emploie au laboratoire de M. Renaut.

Solution A.....	{	Hématéine.....	1 gr.
		Alcool à 95°.....	100 gr.

Faire dissoudre.

Solution B.....	{	Alun.....	50 gr.
		Eau distillée bouillante.....	1000 gr.

Faire dissoudre.

Mêlez les deux solutions à chaud, laissez reposer, filtrez.

Cette préparation est assez altérable à la longue; les premiers jours les colorations obtenues ne sont pas très rapides.

Seule, l'hématéine est un mauvais colorant; il faut former un sel, un aluminate d'hématéine. Assez souvent les solutions d'hématéine sont rougeâtres; on les fait passer au bleu en ajoutant quelques gouttes d'ammoniaque ou, mieux, en lavant la préparation avec de l'eau bicarbonatée à 1 0/00.

Ehrlich (1) recommande la formule suivante :

Eau distillée.....	100 ^{cc}
Alcool absolu.....	100 ^{cc}
Glycérine pure à 30°.....	100 ^{cc}
Acide acétique cristallisable.....	10 ^g
Hématoxyline cristallisée.....	2 ^g
Alun en excès.....	

On expose à la lumière, et on conserve en flacons bien bouchés.

Bleu de Méthylène (Medicinisches Methylenblau chemisch rein und chlorzinkfrei). — C'est une thioindamine. On l'emploie en solutions aqueuses à 1 1000 et en solutions concentrées.

Thionine. — C'est un colorant soufré, voisin du bleu de méthylène comme composition. Heidenhain l'a introduite dans la technique microscopique pour colorer la chromatine. Puis elle a été successivement recommandée par Nicolle, par Marchoux et par Sabrazès. C'est le colorant-type des Mastzellen.

Brilliant kresyblau. — C'est un colorant fabriqué par Mülheim. C'est un corps appartenant à la classe des oxazines, soluble dans l'eau et dans l'alcool. Il a été employé par Ehrlich, par Ascoli, de Pavie, par C. Levaditi., (2).

(1) EHRLICH. — *Zeisch. f. wiss Mikr.*, 1886, p. 150.

(2) C. LEVADITI. — *Journ. de Phys*, 1901, 15 mai, p. 426.
Leucémie myelogène.

Enfin, notons qu'on a proposé d'ajouter aux colorants certains corps chimiques pour renforcer leur action ou faire mieux apparaître les granulations. C'est ainsi que le méthylal (Ehrlich), la créosote (Sabrazès), l'acide acétique (Willebrand) ont été employés avec succès.

LA PRISE DE SANG

Le doigt sera lavé comme nous l'avons dit pour la numération totale.

Le sang sera recueilli sur des lamelles spéciales. Ehrlich y attache une grande importance. L'épaisseur de ces lamelles ne doit pas dépasser $1/10$ de millimètre, le verre ne doit pas être cassant, ne contenir aucune bavure.

Ces lamelles seront lavées dans une solution étendue d'acide chlorhydrique, puis lavées à l'eau, à l'alcool et séchées avec un linge fin ou avec du papier Joseph.

On les utilisera de suite en ayant soin de ne pas les exposer à l'humidité de la buée de la respiration, et de ne pas les toucher avec les doigts.

On pourra également les conserver dans des boîtes fermées.

Le sang sera étalé au moyen d'une lamelle rodée que l'on inclinera à 45° sur la goutte de sang. On aura soin de ne pas étaler la goutte jusqu'à l'extrémité de la lamelle, car les leucocytes s'accumule-

raient à la périphérie et même tomberaient en dehors de la lamelle (1).

On peut aussi mettre une goutte de sang sur la lamelle inférieure, appliquer une lamelle au-dessus et les faire glisser l'une sur l'autre. Ce sont les préparations par frottis.

Les frottis nous ont donné des résultats moins bons que l'étalement.

Les lamelles dont nous nous servons le plus habituellement ont 20 mm. carrés.

Les lamelles plus larges 20 × 76 extra-minces de Cogit, ont l'inconvénient d'être d'un prix plus élevé, d'être plus cassantes et de n'être pas absolument planes. Le sang n'y est pas uniformément réparti. On ne s'en servira que dans les cas où l'on voudrait obtenir de grands champs à examiner, si on veut par exemple rechercher un parasite, rare dans le sang.

On peut faire aussi des préparations directement sur les lames. On devra choisir alors des lames minces, rodées et d'un verre très clair. Ces lames ont l'avantage d'être plus facilement étiquetées et plus faciles à conserver dans les boîtes que les lamelles.

Les préparations ainsi obtenues, on les conservera dans des boîtes fermées, le modèle de Th. Schütter, de Leipzig, est un des plus pratiques.

(1) J. JOLLY. — De la numération des différentes variétés de globules blancs du sang (*Archives de Médecine expérimentale*, 1896, p. 510).

Ce sont des boîtes forme livre, pouvant contenir deux cents préparations.

On pourra utiliser de suite ces préparations pour l'examen du sang ; on les conservera aussi longtemps qu'on le voudra. Des préparations de sang sec étalé depuis un an, conservées à l'abri de la lumière et des poussières, ne se sont pas altérées.

La Fixation

C'est l'opération préalable qui empêchera l'eau de la solution colorante d'altérer la forme des leucocytes.

La fixation se fait par un grand nombre de procédés : nous les diviserons en moyens chimiques et en moyens physiques.

1^o *Moyens chimiques*. — Ils sont fort nombreux ; nous allons indiquer les principaux :

L'*alcool absolu* : on plonge les lames dans un bain d'alcool absolu, on les laisse 15 à 20 minutes, on les retire et on les laisse sécher.

Le *fixateur de Nikiforoff* est un mélange à volumes égaux d'alcool absolu et d'éther anesthésique.

Plonger les lames dans ce bain de 1 à 24 heures.

L'immersion prolongée donne des fixations plus complètes.

L'*acide osmique*, à 1/100, fixera par les vapeurs en 15 ou 20 secondes, les préparations de sang sec.

Cette fixation a le mérite d'être rapide, facile ; mais les colorations ne sont pas toujours très nettes.

Le *formol*, à 1 0/0 en solution alcoolique, est un bon fixateur ; il suffit de verser quelques gouttes de la solution sur la face chargée de sang, pour avoir en 1 à 2 minutes une fixation satisfaisante.

L'*acide chromique*, à 1 0/0, est recommandé par Malassez. On immerge rapidement les lames et on les retire pour les laver plusieurs fois à l'eau distillée.

Enfin, Josué, Société de Biologie, 15 juin 1901, a recommandé le *chloroforme* qui donne des images très nettes, même avec les colorants spéciaux d'Ehrlich.

2° *Moyen physique*. — Le chauffage est une méthode de fixation donnant bien la forme des éléments anatomiques du sang. On chauffera les préparations lentement et progressivement jusqu'à 110°-115° centigrades, en ayant soin de laisser libre de tout contact la face chargée de la lamelle. Il est préférable pour faire ces fixations de se servir d'une étuve à air sec, l'appareil à toluène est peu pratique, le toluène est souvent impur.

D'après Ehrlich, lorsqu'on utilisera des solutions colorantes (acides ou alcalines), la fixation sera poussée plus loin ; deux heures à 120° par exemple.

La fixation par la chaleur est, lorsqu'on veut avoir une vue d'ensemble, la méthode générale de choix.

Les températures trop longtemps élevées altèrent les éléments du sang.

Ce mode de fixation est compatible avec tous les moyens de coloration que nous allons étudier.

Nous allons donc décrire *trois méthodes de coloration typiques* que nous avons employées journellement et dont on peut être sûr.

Ce sont :

1° La double coloration à l'*éosine hémateïne* (pour avoir les éléments acidophiles).

2° La coloration à la *thionine*, élective pour les basophiles.

3° La coloration au *triacide d'Ehrlich*, permettant d'apprécier les neutrophiles.

1° *Coloration des éléments acidophiles.* — On emploie la fixation à l'alcool éther (Nikiforoff) pendant 10 à 30 minutes. Une fixation de quelques heures, loin d'être nuisible, est à recommander.

On fera agir deux colorants successifs : l'*éosine* puis l'*hémateïne*.

Pour colorer le sang, on fera agir une minute la solution d'éosine ; on lave à grande eau. Laisser sécher à l'abri des poussières.

Colorer à l'hémateïne une à deux minutes et laisser sécher. (Voir les solutions page 16).

Monter au Baume du Canada.

Pour J. Sabrazès on obtient aussi d'assez bonnes préparations par l'emploi successif de l'hémateïne et de l'éosine (1).

(1) J. SABRAZÈS. Congrès de Lille 1899, p. 15.

D'après Leredde et Bezançon (1) pour colorer les éléments du sang, commencer par l'hématéine, faire agir ensuite l'éosine.

On doit toujours colorer à l'éosine d'abord, puis faire agir l'hématéine qui est le colorant électif.

Ces préparations sont très claires. Les noyaux des leucocytes sont violets, avec des contours bien nets, les globules rouges sont rouge intense, les granulations éosinophiles se détachent avec une intensité très apparente donnant l'impression du relief. Ce sont des préparations nettes, très esthétiques.

C'est cette méthode que l'on emploiera dans la pratique courante quand il s'agira de déterminer si on a une polynucléose, une mononucléose ou de l'éosinophilie.

2° *Coloration des basophiles.* — Cette coloration s'obtient d'une façon pratique et rapide au moyen de la thionine.

Nous employons la formule donné par Nicolle (2).

On fait une solution saturée de thionine de Merk dans l'alcool absolu.

On prend 10 cc. de cette solution mère et 100 cc. de solution aqueuse phéniquée à 1 %.

Cette solution est filtrée et peut être employée de suite. Elle donne des images remarquablement

(1) E. LEREDDE et F. BEZANÇON. Principales formes cellulaires du tissu conj. et du sang, *Presse Médicale*, 23 nov. 1898. p. 305.

(2) NICOLLE. — Cité par J. Courmont. — Précis de Bactériologie, Paris, 1898.⁷

nettes; les noyaux sont bleu foncé; le globule rouge est vert; les grains basophiles sont très franchement bleus et très nets.

Il faut, pour obtenir une bonne coloration, 1/2 minute environ; on lave très rapidement et très légèrement.

D'ailleurs, cette solution s'altère vite et en quelques jours, sa puissance colorante a diminué au point qu'il faut plusieurs minutes de contact avec les globules pour les colorer.

Nous n'avons pas pu trouver l'explication de ce fait; M. le professeur Courmont pense qu'il faut en incriminer les phénols impurs employés dans les Laboratoires.

Les méthodes de fixation ordinaires peuvent être employées pour la thionine; nous avons obtenu les meilleurs résultats avec le sublimé et le chloroforme.

3° *Coloration des neutrophiles*. — Cette coloration est l'œuvre d'Ehrlich. Nous ne ferons que transcrire la technique décrite dans le *Traité de l'Anémie* (1).

La fixation se fera à l'aide de la chaleur, à 115° et 120° pendant 30 minutes.

Le réactif employé est la triacidlösung d'Ehrlich. On peut se procurer cette couleur chez le Dr G. Grüber à Leipzig. On peut aussi la préparer

(1) P. EHRLICH und LAZARUS. — *Die Anæmie*. Wien. A. Holder, 1898 (Spec. Path. Nothnagel). B. VIII, H. I, p. 12.

soi-même, soit en demandant le mélange de colorants en poudre et le faire dissoudre avant de s'en servir, soit aussi en employant la formule suivante, donnée par Ehrlich.

On fait, au préalable, séparément des solutions saturées dans l'eau distillée d'orange G., de fuschine acide et de vert de méthyle. On filtre séparément, et on les mélange dans l'ordre suivant :

- 14^{cc} d'une solution aqueuse saturée d'orange G.
- 7^{cc} — — — fuschine acide.
- 15^{cc} d'eau distillée.
- 15^{cc} d'alcool à 100°.
- 12^{cc} d'une solution de vert de méthyle,

On agite vivement et on ajoute :

- 10^{cc} d'alcool à 100°.
- 10^{cc} de glycérine.

Ce réactif colorant serait employable immédiatement.

Ehrlich donne comme temps de coloration une à deux minutes au maximum.

M. Sabrazès dans son rapport (Leucémie et Adénie) a trouvé le temps de coloration fort variable; quelquefois plus de vingt heures.

Jamais nous n'avons fabriqué ce réactif nous-même. Avec le réactif de Grübler, s'il est de fabrication récente, les temps donnés par Ehrlich, une à deux minutes sont exacts; si le réactif est vieux il faut un temps plus long, une demi-heure quelquefois. Le réactif paraît s'altérer en cinq à six mois.

Les images cellulaires obtenues sont nettes ; les globules rouges sont violet rouge ; les noyaux des leucocytes sont bleu pâle ; les granulations polynucléaires neutrophiles, violet foncé ; les éosinophiles, rouge lie de vin ; les basophiles ne sont pas apparents.

Ce procédé de coloration est bon, mais il demande une fixation soignée et un bon réactif. Les images sont claires, on a cependant quelque difficulté à bien colorer les noyaux des leucocytes. Souvent ceux-ci sont bleu pâle, à contours peu nets, et on peut hésiter entre des polynucléaires et des mononucléaires neutrophiles.

Pour remédier à cet inconvénient on lave les préparations dans un cristalliseur et non pas à grande eau. La préparation une fois colorée est passée deux fois rapidement dans l'eau du cristalliseur, on la fait égoutter et sécher. On vérifie la coloration avant de la monter dans le baume. Il est souvent impossible de dire au simple aspect de la teinte si une préparation est suffisamment colorée.

CHAPITRE III

En dehors de ces trois colorations que nous qualifierons d'essentielles, il en est un grand nombre d'autres fort utiles, mais aucune d'elles n'est cependant indispensable. Dans la coloration par l'éosine hémateïne, l'hémateïne a été remplacée par une substance basique qui est, le plus souvent, le bleu de méthylène. Le bleu de méthylène à employer est le bleu de méthylène médicinal de la marque Hœchst et non pas la marque Merck comme le recommandent certains traités. Merck ne fabrique pas cette couleur.

Ehrlich a proposé le mélange suivant :

Eosine.....	0 gr. 50 centigr.
Alcool à 70°.....	100 gr.
Bleu de méthylène en solution aqueuse, saturée..	40 cc.
Eau distillé.....	40 cc.
Faire dissoudre.	

Cette coloration est assez lente pour M. Sabrazès, il faut 6 à 24 heures en vase clos à 37°. Le bleu employé est souvent très actif et alors on doit colorer au préalable à l'éosine.

On recommande beaucoup le mélange Romanowski et Ziemann. Nous en avons obtenu de bons résultats.

Voici la formule :

Bleu de méthylène médicinal pur, à 1 %....	1 partie.
Eosine à 0,1 %.....	5 parties.

La coloration nécessitera 20 minutes. Il se fait souvent un précipité de l'excès des colorants des solutions. On les enlèvera au buvard.

Les granulations éosinophiles sont rouges, les noyaux leucocytaires sont bleus.

Tout récemment, von Willebrand (1) a proposé une nouvelle méthode pour colorer simultanément les préparations de sang sec avec l'éosine et le bleu de méthylène. Il se sert de la solution suivante :

Eosine à 5 0/0 en solution alcoolique à 70%.	} à à
Bleu de méthylène en solution aqueuse	
concentrée	

Cette solution ainsi formulée colore les préparations en bleu diffus. L'éosine prend un pouvoir colorant de plus en plus fort si on ajoute par gouttes

(1) VON WILLEBRAND. — Eine methode für gleichzeitige Combinationsfärbung von Blutrocken praeparaten mit Eosin und Methylenblau. *Deutsch. Med. Woch.* 24 janvier 1900, p. 57.

de l'acide acétique dilué à 1 0/0. Il faut en moyenne à 50 cent. cubes du premier liquide ajouter 10 à 15 gouttes de la solution acétique. On filtrera avant de s'en servir.

Les préparations doivent être bien fixées, (chaleur sèche, alcool ou alcool formique à 1 0/0). La coloration se fait en 5 ou 10 minutes en chauffant plusieurs fois jusqu'à apparition de vapeurs. On lave à l'eau, on ne décolore pas.

Les érythrocytes sont rouges, les noyaux bleu foncé, les granulations neutrophiles violettes, les acidophiles en rouge, les granulations des mastzellen en bleu foncé.

Sabrazès (1) remplace le méthylal par la créosote de hêtre. Il donne la formule suivante :

Créosote de hêtre.....	II gouttes
Solution extemp.d'éosine pure à 1 0/0	X gouttes
Solution extemp. et filtrée de bleu de méthylène pur à saturation dans l'eau	X gouttes

Ce réactif est peu pratique ; il faut préparer chaque fois des solutions aqueuses saturées, les filtrer ; il y a beaucoup de temps perdu.

« Si la fixation par la chaleur à 120° est suivie d'un surcroît de fixation dans l'alcool absolu, on a des préparations qui permettent de différencier les Mastzellen mieux que tout autre méthode ; mais les

(1) SABRAZES. — Rapport Congrès de Médecine. Lille 1899.
page 12.

granulations neutrophiles ne sont pas très apparentes. » Sabrazès.

L'addition du méthylal donne après fixation à 115° pendant 1 à 2 heures d'excellents résultats. On peut conseiller la formule suivante d'Ehrlich.

Solution aqueuse d'éosine à 1 ‰	10 ^{cc}
Méthylal	8 ^{cc}
Solution aq. de bleu de méthylène médicinal	10 ^{cc}

Souvent, dans ces préparations, les tons éosinés sont pâles ; aussi recommande-t-on de colorer au préalable à l'éosine saturée aqueuse à 1 ‰.

On a alors les Mastzellen en bleu, les éosinophiles en rouge, les neutrophiles en violet.

Nous avons essayé cette méthode ; elle ne nous a pas donné les bons résultats que nous en attendions.

Tout récemment C. Levaditi (1) a appliqué à la coloration du sang vivant le Brilliantkresylblau de la fabrique Mülheim. Cette matière colorante avait déjà été employée par Ehrlich et Ascoli pour l'étude du sang et par Nakanishi (2) pour l'étude des bactéries.

On prépare une solution faible de Brilliant-Kresylblau dans l'alcool absolu. On étale une couche de cette solution sur des lames très propres ; on dessèche

(1) LEVADITI. — *Journal de Physiologie et Pathologie générale*, 15 mai 1901, page 19.

(2) NAKANISHI. — *Deutsch. Med. Woch.*, 1900.

à l'air, on place sur cette surface la goutte de sang, on l'étale, on enduit les bords de la lamelle couvre-objet d'un peu de vaseline. On peut conserver ainsi des préparations pendant quatre heures. Les éosinophiles sont faiblement teints vert bleuâtres ; les myélocytes neutrophiles sont violacés.

Nous n'avons pas obtenu de belles préparations par ce procédé ; mais si on fixe au préalable la préparation au chloroforme et, si on la colore ensuite, on a des préparations d'une finesse remarquable en ce qui concerne les Mastzellen.

CONCLUSIONS

1^o L'examen, même élémentaire, du sang n'est possible qu'en employant des méthodes de coloration pour les leucocytes. Ces méthodes sont nombreuses, on en décrit tous les jours de nouvelles.

2^o Les trois colorations indispensables sont la double coloration à l'*éosine-l'hématéine*, la coloration à la *thionine* et la coloration au *triacide d'Ehrlich*. Elles permettent de distinguer très nettement toutes les espèces de granulations.

3^o La fixation du sang, au moyen du *chloroforme* suivant la méthode décrite par Josué, a fait faire un grand progrès à la technique hématologique.

Cette fixation remplace avantageusement la fixation par la chaleur à 115°, toujours difficile à obtenir.

VU :

Le président de la thèse,

J. COURMONT.

VU :

Le doyen,

LORTET.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Lyon, le 3 juillet 1901.

*Le recteur, président du Conseil
de l'Université,*

G. COMPAYRÉ.

BIBLIOGRAPHIE

Nous avons consulté l'original de presque tous les ouvrages cités dans ce résumé bibliographique. Des indications bibliographiques très complètes se trouvent dans les ouvrages d'Ehrlich et Lazarus, dans celui de Türck et d'Engel. Nous ne donnons ici que les indications bibliographiques les plus importantes et les plus récentes.

ALFEROW. — *Archives de physiologie*, 1884, page 271.

BARJON et REGAUD. — Des procédés de coloration des globules blancs du sang, basés sur l'emploi des sérums artificiels colorés. *Lyon méd.*, 1895, p. 115.

BESREDKA. — Etat actuel de la question de la leucocytose. *Ann. Inst. Pasteur*, 1897, p. 731.

BESREDKA. — Du rôle des leucocytoses dans l'intoxication par une combinaison sulfurée d'arsenic. *Ann. Inst. Pasteur*, 25 janvier 1899.

BESREDKA. — Du rôle des leucocytoses dans l'intoxication par un composé arsenical soluble. *Ann. Inst. Pasteur*, mars 1899.

BOLLES LEE et HENNEGUY. — Traité des méth. de l'Anat. micr.

BORISSOFF. — Des granulations amphophiles. *Société pathol. Londres*, 19 octobre 1894.

CARO. — Ueber Leukocytose und Blutalkalescenz. *Zeitschr. für Klin. med.*, 1896, volume XXX page 339.

- CASTELLINO. — Leucocytose chez les pneumoniques agonisants.
- CHENZUSKI. — *Zeit. f. wiss. Mikr.* XI, 2, 1894.
- CHANTEMESSE. — Le globule blanc. *Presse médicale*, 7 décembre 1898.
- CHANTEMESSE et REY. — Note sur la formule hémoleucocytaire dans l'érysipèle. *Société Biolog.*, 18 janvier 1899.
- CHANTEMESSE et REY. — De la leucocytose dans l'érysipèle. *Société Biolog.*, février 1899.
- J. COURMONT et C. LESIEUR. — La polynucléose de la rage. *Journal de Physiologie*, juillet 1901.
- J. COURMONT et V. MONTAGARD. — La leucocytose dans la variole. *Journal de Phys.*, juillet 1900, p. 557. — La mononucléose de la variole. *Journal de Phys. et de Path. gén.*, septembre 1900, p. 781.
- P. COURMONT et J. NICOLAS. — Etude de la leucocytose dans la diphtérie expérimentale. *Soc. de Biol.*, 1897, *Journal de Phys. et de Path. gén.*, 1900, p. 973.
- P. COURMONT et BARBAROUX. — Leucocytose et polynucléaires dans la fièvre typhoïde. *Journal de Phys.*, 1900, p. 578.
- P. EHRLICH. — Beiträge zur Kennt. der granulirten Zellen. *Verhandl. d. phys. Gesellschaft zu Berlin*, 1878-1879, n° 8.
- P. EHRLICH und A. LAZARUS. — Die Anämie. Normale und pathologische. *Histol. des Blutes*, 1898, in *Spec. Path. und Ther.* herausgegeben von Prof. Nothnagel Bd VIII; Theil I, Heft I. Holder. Wien.
- P. EHRLICH, A. LAZARUS und PINKUS. — Die Anämie Theil II, Heft II. Leukaemie und Pseudoleukaemie. 1901.
- EHRLICH. — Ueber schwere anæm. Zustände XI^e Congrès für innere Medic. 1892.
- ELZHOlz. — Neue Methode zur Bestimmung der absoluten Zahlenwerthe der einzelnen Leukocytenarten in Cubikmillimeter Blut. *Wiener Klin. Woch.*, 1894, n° 32.
- ENGEL. — Beiträge zur Kenntniss der Leukoc., Berlin, 1898.
- ENGEL. — *Munch. medic. Woch.*, 22 janv. 1901.
- S. FELSENTHAL. — Hämatalogische Mittheilungen, *Archiv. für Kinderheilk.* XV Jahrg., 1893.

GABRITSCHESKY. — De la leucocytose dans la diphtérie. Ann. Inst. Pasteur, 25 oct., 1894.

GILBERT. — Traité de path. gén., T. IV. Sémiologie du sang.

C. GRAEBER. — Zur Klinischen Diagnostik der Blutkrankheiten. Hämatalog. Studien. Leipzig, 1888.

E. GRAWITZ. — Methodik der Klinischen Blutuntersuchungen. Berlin.

H. GONTIER-LALANDE. — Etude pratique des reactifs colorants employés en technique microscopique. Thèse Bordeaux, 1900, 96 pages.

HAMBURGER. — *Chemisch. centralbl*, 19 août, 1896.

HAYEM. — Du sang. Paris 1889.

HAYEM. — Des altérations des globules blancs et de la présence dans quelques cas, de globules rouges à noyau dans le sang (*Société de Biologie*, 11 février 1899).

R.-V. JAKSCH. — Klinische Diagnostik innerer Krankheiten. 4 Aufl. Wien, 1896. Urban und Schwarzenberg.

J. JOLLY. — Sur la numération des différentes variétés des globules blancs du sang. *Arch. medec. exp.*, 1896, page 310.

J. JOLLY. — Recherche sur la valeur morphol. et la signification des différents types de globules blancs. *Arch. Med. exp.*, 1897.

JOSUÉ. — La fixation du sang par le chloroforme, *C. R. Société de biol.*, 1901 15 juin.

H. KOHN. — Examen bactériologique du sang dans les maladies infectieuses, *Société de méd. int. de Berlin*, 7 décembre 1896.

LAIGNEL. — *Société Méd. des Hôpitaux*, 19 avril 1901.

LEFÈVRE. — Traité des mat. color. org. et art. 1896.

LEREDDE et LOEPER. — Equilibre leucocytaire, *Presse médic.*, 25 mars 1899.

C. LEVADITI. — *Journal de physiologie et path. génér.* 15 mai 1901.

LICHTWITZ et SABRAZÈS. — Etat du sang. Formule hémat. des adénoïdiens avant et après le traitement, Paris 1900.

LIGOUZAT. — Les cellules éosinophiles, leur signification, leur valeur diagnostique. Thèse de Lyon 1894.

R. v. LIMBECK. — Grundriss einer, klin. path. des Blutes, 2 Aufl. Jena 1896.

- R. v. LIMBECK. — Praktische Ergebnisse der modernen Blutuntersuchung *Wiener medic. Wochensch.*, 1897, n° 5-8.
- LYONNET et MARTEL. — Un nouveau procédé de numérations, des leucocytes, *Lyon Méd.*, 1899, p. 431.
- MARAGLIANO. — Verhandlungen des XI Congr. f. inn. Medicin. Leipzig, 1892, p. 33.
- MARAGLIANO. — Verhandlungen d. int. med. Congr. in Berlin, 1891. Abth V.
- MAYET. — *Lyon Médical*, 3 février 1901, p. 148. De la numération des globules blancs.
- MOREL. — Note sur les diverses leucocytoses post-phlébotomiques et post-révolusives. *Acad. médec.*, 1896.
- MORITZ. — Les granul. basoph. des glob. rouges. *Deutsch Med. Woch.*, 31 janvier 1901.
- MULLER und RIEDER. — Ueber Vorkommen und Klinische Bedeutung der eosinoph. Zellen im circulirenden Blute des Menschen. *Deutsch Arch. für. Kl. Med.*, B. 48, 1891.
- NAKANISHI. — *Deutsch Med. Woch.*, 1900.
- PARMENTIER. — Maladies du sang. *Traité de Méd.*, Brouardel-Gilbert, t. VI, p. 789. Paris, 1899.
- H. PÉE. — Untersuchungen über Leukocytose. *Dissert. inaug.* Berlin, 1890.
- RANVIER. — Recherches sur les éléments du sang. *Arch. Phys.*, 1875.
- REY. — Etude clinique et exp. de la leucocytose dans l'érysipèle. Thèse, Paris, 1899.
- RIEDER. — Beiträge zur Kenntniss der Leukocyt. Leipzig, 1892; Atlas der Klin Mikroskopie des Blutes. Leipzig, 1893.
- ROGER et JOSUÉ. — Des modifications de la moelle osseuse de l'homme dans l'infection staphylococ. *Société Biolog.*, 28 mars 1897.
- ROGER et JOSUÉ. — La moelle osseuse (volume n° 21 de collect. de l'OEuvre Médico-Chirurgical 1900.
- J. SABRAZÈS. — Hématologie clinique. Paris, 1900. Soc. d'éd. scient. Tirage à part du Rapport au Congrès de Médecine. Lille, 1899 : Leucémie et Adénie.
- STIENON. — Leucocytose dans les maladies infect. *Ann. Société royal. des Sciences Nationales de Bruxelles*, t. IV, 1898.

- THOMA C. — Die Zählung der weissen Zellen des Blutes.
Virchows Archiv., B. 87, 1882.
- TURCK. W — Kl. Unters. über das Verhalten des Blutes bei
acuten Infectiouskrankheiten Wien und Leipzig, 1898.
Braumüller.
- SABRAZÈS. — Extrait de la *Gaz. hebd. des Sciences médic. de
Bordeaux*, octobre 1900.
- VILLON. — Traité prat. des mat. colorantes, 1890.
- VILD. — Teneur du sang en hémoglobine, en globules rouges
et en leucocytes pendant la grossesse et après l'accouche-
men. *Arch. für Gynäkol.*, t. LIII. 2, 1898.
- VIRCHOW (R). — Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaft-
lichen Medicin. Francfort, 1856.
- VIRCHOW (R). — Die Cellularpathologie, 4 Aufl., Berlin, 1871.
- WILLEBRAND. — *Scand. Arch.f. phys.*, p. 37. 1900.
- WILLEBRAND. — *Deutsche med. Wochen*, 24 janvier 1901.
Méthode pour colorer simultanément les préparations de
sang par l'éosine et le bleu de méthylène.
- WURTZ. — *Dict. de Chimie*, t. I, 1^{er} et 2^e supplément.
- J. ZAPPERT. — Eine methode zur Zählung der eosinoph.
Zellen im frischen Blute. — *Centralbl. für Klin Medic.*,
1892, n° 19.
- J. ZAPPERT. — Ueber das Vorkommen der eosinophilen
Zellen im menschlichen Blute. *Zeitsch. für Klinisch.
Medicin.*, Bd. XXIII, 1893.

